Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning

Untersuchungen zur Frage der zusätzlichen paratumoralen u. intramuskulären Vitamin E-Wirkung bei der Strahlentherapie experimenteller Geschwülste

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg 1963

Vorgelegt von:
Claus Lehr
aus Erlangen

D 29

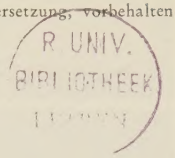
1963 № 164

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Dekan: Prof. Dr. A. Windorfer
Referent: Prof. Dr. Dr. G. Barth
Correferent: Prof. Dr. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 1963

Sonderdruck aus
STRAHLENTHERAPIE Band 122, Heft 3 (1963)
Herausgegeben von J. Becker, R. Birkner, H. Langendorff, H. Meyer
VERLAG URBAN & SCHWARZENBERG / MÜNCHEN UND BERLIN
Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten



Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen-Nürnberg (Direktor: Prof. Dr. *N. Henning*) und der Wilhelm-Conrad-Röntgen-Klinik der Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. Dr. *G. Barth*)

Zusätzliche medikamentöse Behandlung des Tumorbettes

VI. Mitteilung: Untersuchungen zur Frage der zusätzlichen paratumoralen und intramuskulären Vitamin-E-Wirkung bei der Strahlentherapie experimenteller Geschwülste

Von

Gunther Barth, Herbert Graebner, Walter Kern und **Claus Lehr**

Mit 12 Abbildungen

Im Rahmen der Untersuchungen zur Frage einer zusätzlichen Medikation bei optimaler Tumorbestrahlung interessierte in unmittelbar vorangegangenen Experimenten [1, 2] der Einfluß von Vitaminen des B-Komplexes, die sich bisher unter anderem in der Behandlung des Strahlensyndroms bewährten, auf Tumorvolumenänderung und Überlebensrate bei Bestrahlung des Crocker-Sarkom S 180.

Vitamin E als bekanntes Antioxydans hemmt die Lipoidperoxydbildung unter Strahleneinwirkung. So erklärt sich *Fischer* [3] eine geringere Ausbildung der Strahlenkrankheit bei Patientinnen mit Genitaltumoren, die zusätzlich mit Vitamin E behandelt wurden. Der Einfluß des Vitamins auf die allgemeine Verträglichkeit der Bestrahlung von Tumoren ist weiterhin von Interesse, da es durch das Eingreifen in die Atmungskettenphosphorylierung eine bessere Sauerstoffutilisation des Gewebes herbeiführt [4, 5] und die Kapillarfragilität unter Strahleneinwirkung herabsetzen soll [6], zwei wesentliche Kriterien, die bisher zu einer besseren Abheilung von Experimentaltumoren geführt haben [7, 8, 9].

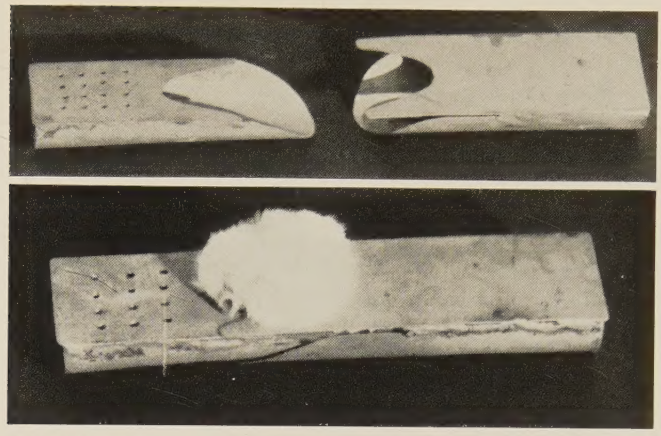
Diese Eigenschaften des Vitamin E gaben Anlaß, die Reaktion von Impftumoren auf zusätzliche Vitamin-E-Gaben zu studieren.

Eigene Versuche

Methodik

Die Experimente wurden an insgesamt 305 männlichen weißen Mäusen des Inzuchtstammes NMRI vorgenommen. Als Versuchstumor diente wiederum das unter der Bezeichnung S 180 bekannte Crocker-Sarkom der Maus.

Die bisherige Meßmethode zur Bestimmung des Tumorvolumens nach der Zylinderformel hatte eine zu große Auswahl der Tumoren nach der Form zur Folge. Sphäroide



a

b

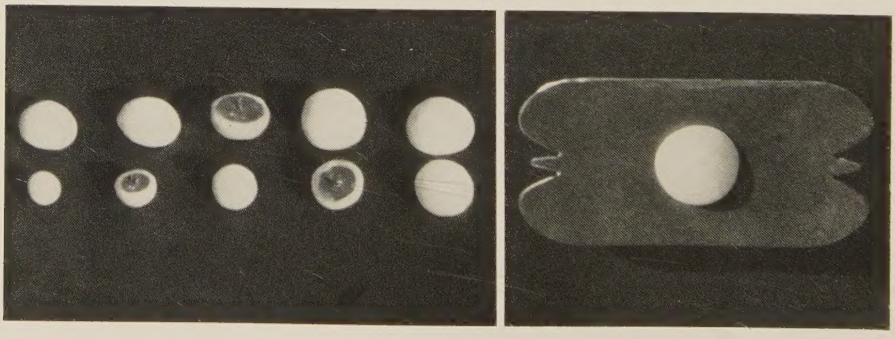
Abb. 1. Meß- bzw. Bestrahlungskäfig. a: Die beiden Teile, auseinandergenommen, mit den parabolischen Ausschnitten an der oberen planen Fläche; b: Maus im Meßkäfig, aus dem der Tumor herausragt.

Tumorformen mußten aussortiert werden. Deshalb wurde eine Methode entwickelt, wonach die Tumorvolumina durch Wasserverdrängung bestimmt wurden. Es wurde dazu ein auch als Bestrahlungskäfig zu verwendender Behälter konstruiert, dessen beide Teile eine plane obere Fläche mit je einem parabolischen Ausschnitt erhielten. Zusammengeschoben entsteht so eine Öffnung, die der Basis jedes zu messenden Tumors gut angeglichen werden kann. Der Tumor muß vollständig mit möglichst wenig gesundem Gewebe über dieser Öffnung zu liegen kommen (Abb. 1).

Um das Gerät auf seine Meßgenauigkeit zu prüfen, wurden genormte Volumina in Form von Stearinhalbkugeln, deren Rauminhalt durch Wasserverdrängung genau bestimmt wurde, auswechselbar auf einer planen Metallplatte befestigt und diese wie der Tumor gegen eine schlaffe Gummimembran gedrückt (Abb. 2).

Eine Erhöhung des Membrandruckes um 5 cm Wassersäule (Abb. 3) konnte den bei dieser Meßmethode auftretenden Fehler um ein beträchtliches vermindern.

Als Vitamin-E-Präparat verwendeten wir das uns freundlicherweise von der Deutschen Hoffmann-La Roche AG. zur Verfügung gestellte Ephynal.



a b

Abb. 2. Stearinhalbkugeln, deren Volumina zur Eichung des Meßgerätes durch Wasserverdrängung genau bestimmt wurden (a). Die Halbkugeln sind auswechselbar auf einer planen Metallplatte befestigt (b).

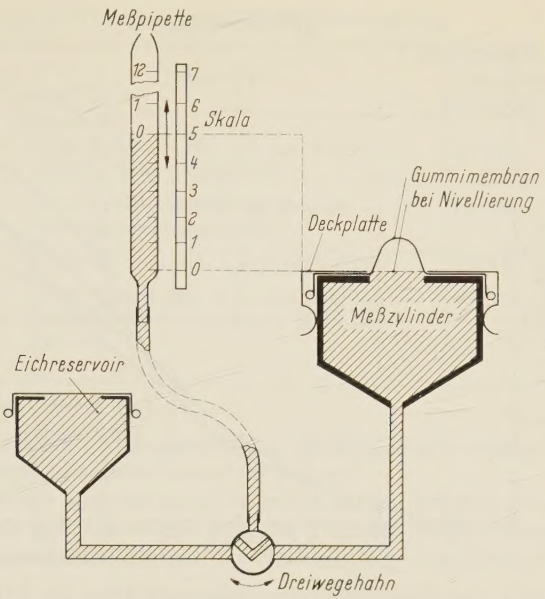


Abb. 3. Schematische Übersicht über das Tumormeßprinzip

Versuchsergebnisse

In einer Vorversuchsreihe sollte zunächst Vitamin E in seiner Wirkungsweise ohne Röntgenbestrahlung geprüft werden. Da sich bei der Verabreichung der üblichen Vitamin-E-Dosen (entsprechend 30 mg Vitamin E bei einem erwachsenen Menschen mit 70 kg Körpergewicht) keinerlei therapeutische Beeinflussung des Sarkom 180 zeigte, wurden als Einzeldosen 1 mg bzw. 10 mg Ephynal/die für ein durchschnittliches Tierkörpergewicht von 20 g festgelegt. Verdünnungen des Inhalts einer Handelsampulle wurden mit Hilfe von physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen.

Als Ergebnis der Vorversuchsreihe (s. Tab. 1) zeigte sich, daß bei einer paratumoralen Verabreichung des Ephynal die Tumoren vom 10. Tag an deutlich schneller wuchsen als die Tumoren der unbehandelten Kontrollen. Bei intramuskulärer Applikation, also bei Behandlung des Gesamtorganismus, machte sich der tumorwachstumsfördernde Effekt besonders bemerkbar. Dabei blieb völlig gleichgültig, ob 1 mg oder 10 mg Ephynal/die verabreicht wurden (Abb. 4).

Bei den Absterbekurven bot sich ein der Tumorentwicklung äquivalentes Bild, indem die mit Ephynal behandelten Tiere vom 12. Tag nach Tumortransplantation ab gegenüber den unbehandelten Kontrollen beschleunigt verendeten (Abb. 5).

Tabelle 1. Vorversuchsübersicht.

Gruppe	Anzahl der Tiere	Vitamin-E-Dosierung
I	30	Tumorwachstumskontrollen
II	20	10 mg paratumoral
III	20	10 mg intramuskulär
IV	20	1 mg paratumoral

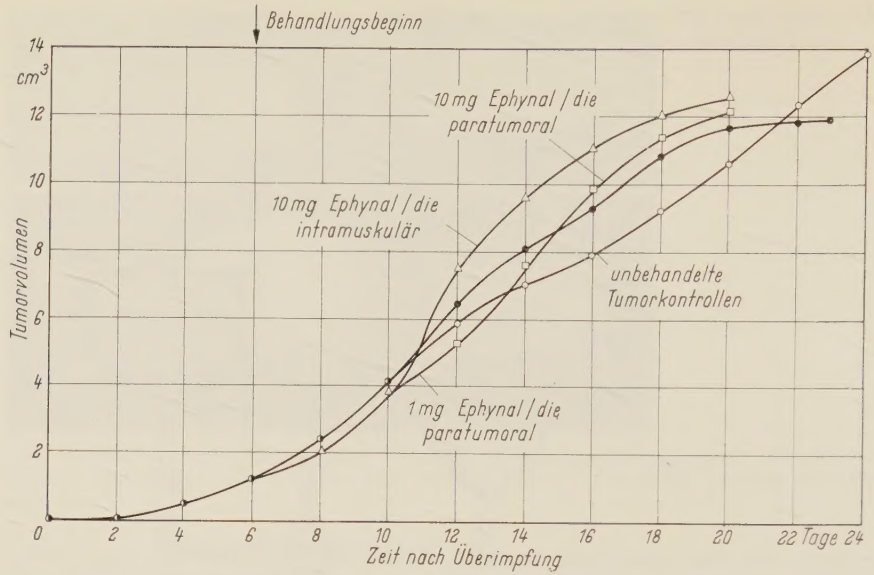


Abb. 4. Durchschnittliche Tumorvolumenentwicklung von S 180 unbehandelt und unter täglichen Gaben von 10 mg bzw. 1 mg Ephynal paratumoral sowie von 10 mg Ephynal i.m. Unter Vitamin-E-Gaben zeigt sich etwas vermehrtes Wachstum.

Für die folgenden Bestrahlungen wurde nach den Ergebnissen des Vorversuchs eine Dosierung von 1 mg Ephynal täglich zugrunde gelegt (Tab. 2). Bestrahlt wurde unter Tiefentherapiebedingungen in der gleichen Weise wie bei *Barth, Graebner* und *Wachsmann* [10]. Um die mögliche Wirkung des Ephynal-Emulgators zu prüfen, wurde das Lösungsmittel in der gleichen Verdünnung wie das Ephynal paratumoral appliziert.

Die Ergebnisse der Röntgenkontrollen boten ein anderes Bild als in früheren Versuchen [10]. Der Tumor wuchs zunächst bis zum 8. Tag an und erreichte dabei

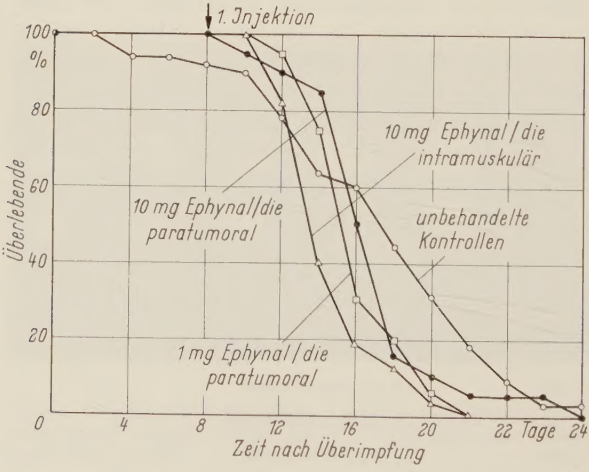


Abb. 5. Überlebenszeiten bei unbehandelten Tieren und unter täglicher Gabe von 10 mg bzw. 1 mg Ephynal paratumoral und von 10 mg Ephynal i.m. Rascheres Absterben der mit Vitamin E behandelten Tiere, besonders bei i.m. Applikation.

Tabelle 2. Behandlung mit Vitamin E unter Röntgenbestrahlung.

Gruppe	Anzahl der Tiere	Behandlung	Gesamttumor-dosis korrigiert*
I	50	510 R/2d* + tägl. 0,2 ccm physiol. NaCl-Lösung paratumoral	4080 R
II	50	510 R/2d + tägl. 1 mg Ephynal paratumoral	4080 R
III	50	510 R/2d + tägl. 1 mg Ephynal i.m.	4080 R
IV	25	510 R/2d + tägl. 0,2 ccm Ephynal-Lösungsmittel paratumoral (1:10 verdünnt)	4080 R

* vgl. [10].

ein Durchschnittsvolumen von 4 cm^3. Nach kurzzeitiger Rückbildung entwickelte er sich dann bis zu einem Durchschnittsendwert von 3,2 cm^3.

Sowohl unter paratumoraler als auch intramuskulärer Vitamin-E-Behandlung erreichten bis zum 8. Tag nach Bestrahlungsbeginn die Tumorvolumina höhere Werte als bei den Röntgenkontrollen. Eine geringe Rückbildung nach Ende der

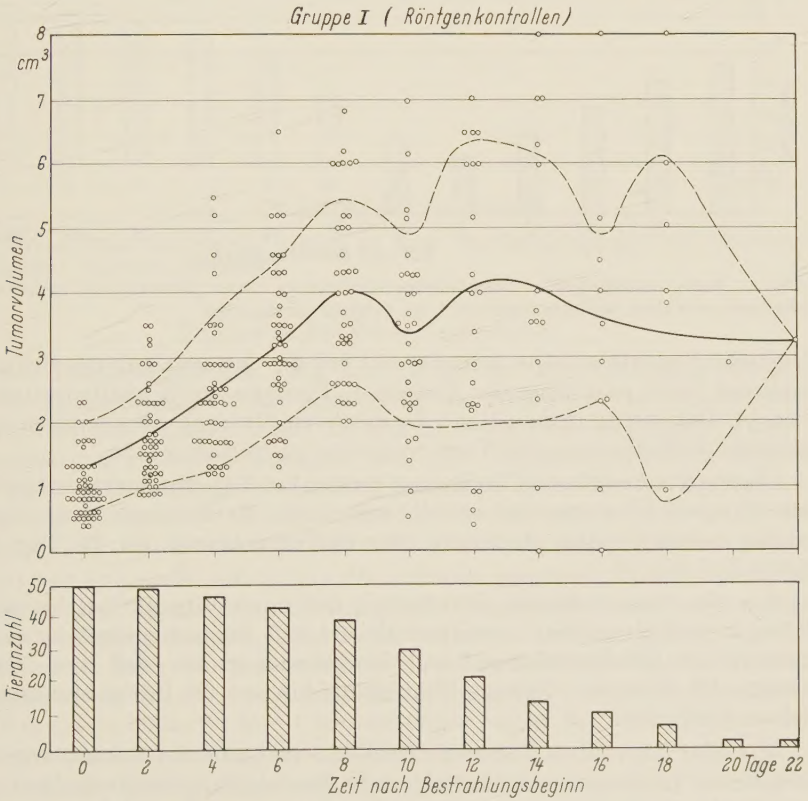


Abb. 6. Röntgenkontrollen. Bestrahlung im 48-Stunden-Rhythmus.

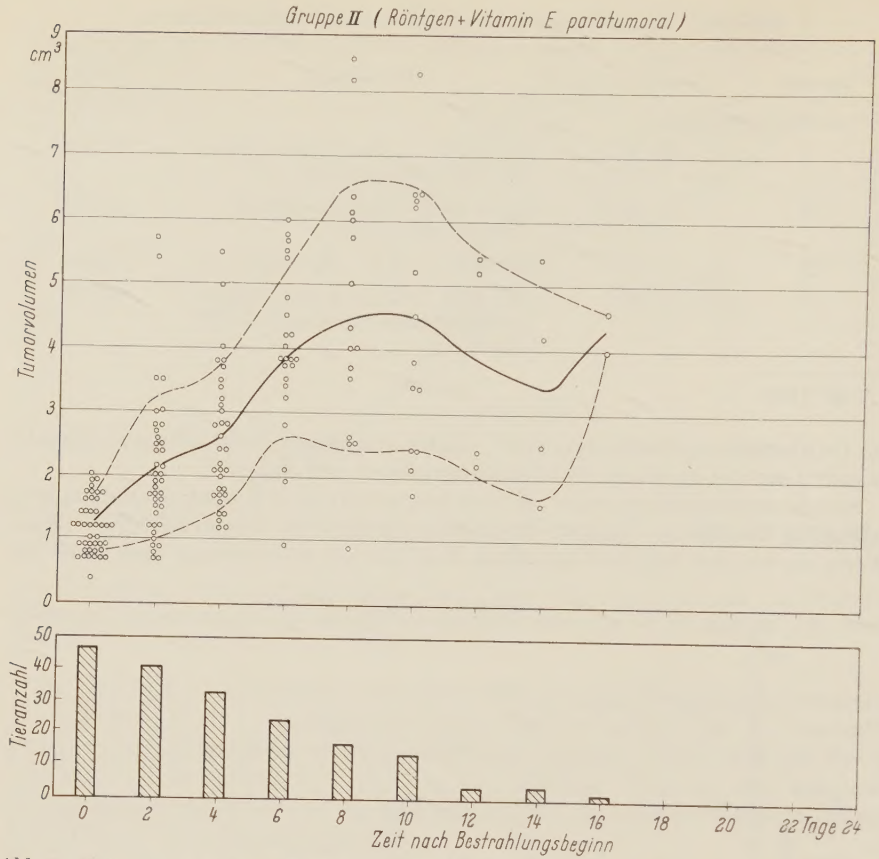


Abb. 7. Keine entscheidende Tumorvolumenrückbildung unter Bestrahlung im 48-Stunden-Rhythmus und einer täglichen Gabe von 1 mg Ephynal paratumoral.

Bestrahlungsserie erfolgte zunächst nur bei der intramuskulären Behandlung, während unter paratumoraler Vitamin-E-Therapie die Wachstumskurve gegen den 14. Tag anstieg und an Hand der mittleren Streuung am wenigsten eine einheitliche Beeinflussung des Tumorvolumens ersichtlich wurde.

Die überraschend besten Ergebnisse wurden bei der paratumoralen Applikation von Ephynal-Lösungsmittel erzielt, wobei sich die Tumoren schon nach dem 4. Tag zurückzubilden begannen. Der Endwert betrug am 24. Tag 1,0 cm^3 (Abb. 6, 7, 8 u. 9).

Aus den Absterbekurven geht hervor, daß unter Vitamin-E-Behandlung die Tiere wesentlich rascher abstarben als bei den Röntgenkontrollen und unter zusätzlicher Emulgatorbehandlung. Erwähnenswert ist, daß zwei Tiere der Gruppe IV (Röntgen + Ephynal-Emulgator) bis zum 28. Beobachtungstag überlebten (Abb. 10).

5% aller bestrahlten Tumoren ulzerierten im Laufe der Behandlung. Da sich bei diesen Tieren eine stärkere physische Beeinträchtigung bemerkbar machte, wurden klaffende Ulzera unter Penicillinschutz durch Knopfnähte verschlossen.

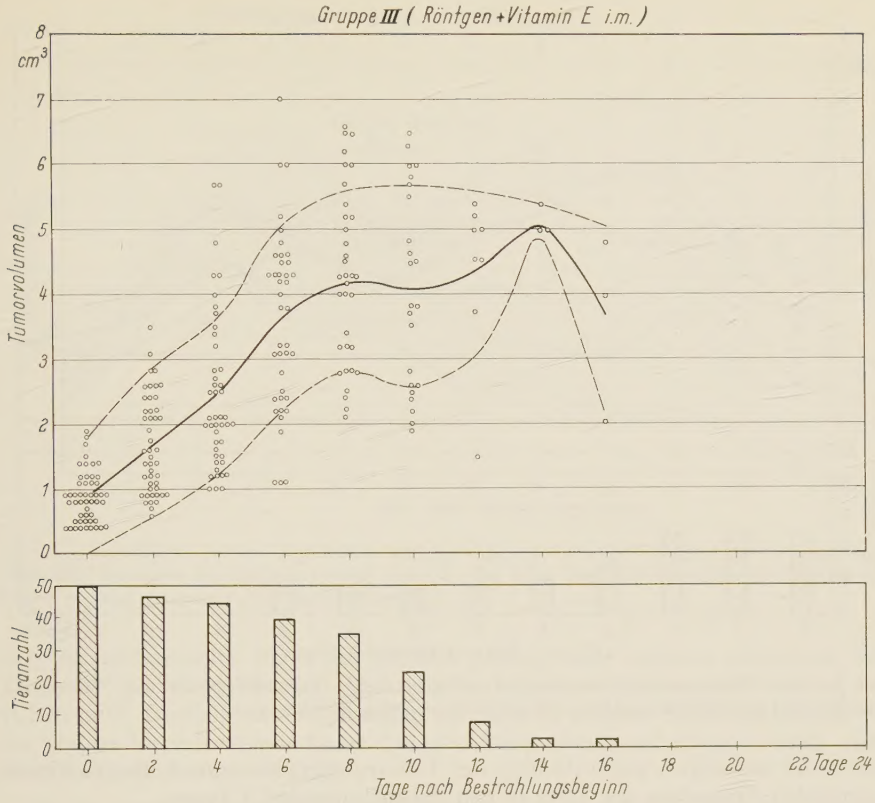


Abb. 8. Geringe Tumorvolumenbeeinflussung am Ende der Bestrahlungsserie bei zusätzlicher intramuskulärer Vitamin-E-Behandlung.

Diskussion der Versuchsergebnisse

Bei den Röntgenkontrollen sank das Niveau der Tumorvolumina bis zum Ende der Beobachtungszeit nur sehr wenig ab. Außerdem fiel eine breitere Streuung der Tumortageswerte auf. Da sich durch die Verbesserung der Tumorvolumenmessung genauere Aussagen über die Volumenentwicklung machen ließen, erhebt sich auf Grund der großen Unterschiede zu früheren Ergebnissen bei alleiniger Röntgenbestrahlung am gleichen Versuchstumor die Frage, ob ein homozygoter Mäusestamm sich für Bestrahlungsversuche an Impftumoren eignet.

Weiter war eine wesentlich höhere Absterberate gegenüber Vorbefunden [10] auffällig, so daß für die Zeit der biologischen Nachreaktion nur sehr wenige Tiere zur Verfügung standen. Diese Tatsache findet darin ihre Erklärung, daß die während der Bestrahlungsserie behandelten Tumoren auffällig groß wurden. Damit erwies sich bei der 48-Stunden-Bestrahlung die verwendete Einzeldosis von 510 R als zu hoch. Weitere Untersuchungen sollen die Verträglichkeit der Tumorbestrahlung an Inzuchtmäusen klären.

Diese Schlußfolgerung findet auch eine deutliche Bestätigung in den Ergebnissen der zusätzlich mit Ephynal-Lösungsmittel behandelten Tiere. Auch hier

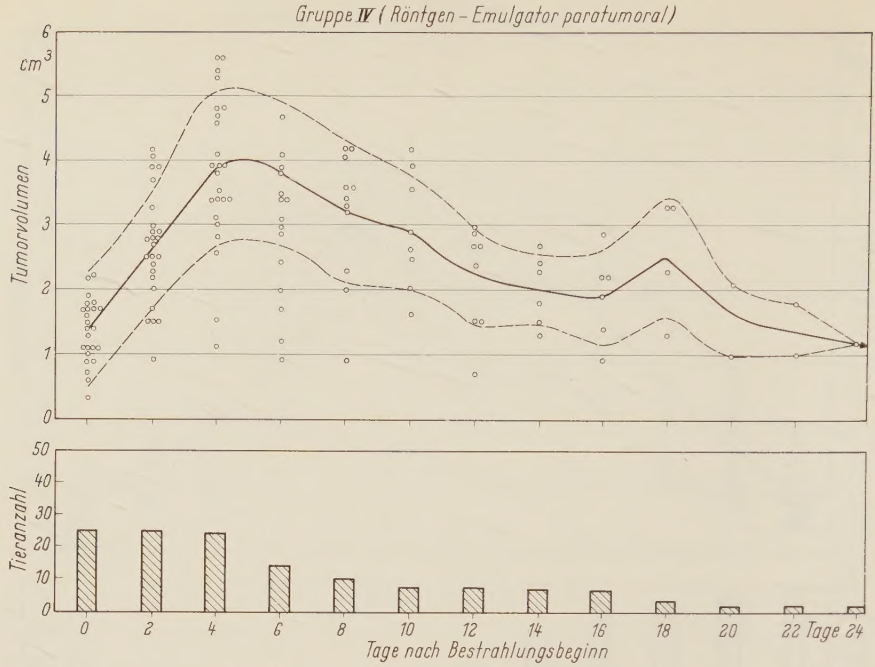


Abb. 9. Gute Volumenrückbildungstendenz bei zusätzlicher Behandlung mit dem Vitamin-E-Lösungsmittel paratumoral und Bestrahlung im 48-Stunden-Rhythmus.

führte der anfänglich steile Anstieg der Tumorgrößen bis zum 4. Tag zu einem vermehrten Absterben der Tiere in den darauffolgenden 4 Tagen.

Der im Vorversuch zu ermittelnde Einfluß von Vitamin E zeigte einerseits durch die raschere Volumenzunahme in Übereinstimmung mit *Frey* [11] einen wachstumsstimulierenden Effekt auf junges, insbesondere undifferenziertes

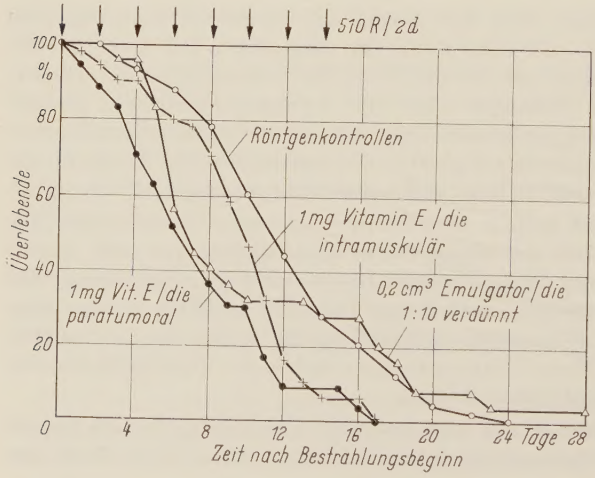


Abb. 10. Absterbekurven. Geringere Mortalität bei den mit Vitamin-E-Lösungsmittel behandelten Tieren gegenüber Röntgenkontrollen.

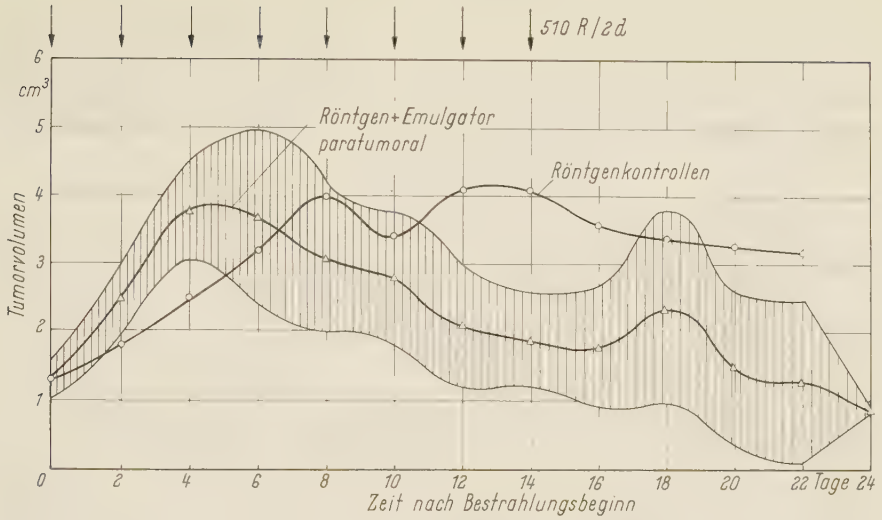


Abb. 11. Signifikant bessere Ergebnisse der mit Ephynal-Lösungsmittel behandelten Tumoren gegenüber alleiniger Röntgenbehandlung vom 11. Tag nach Bestrahlungsbeginn ab (schraffierte Fläche = 3mal mittlerer Fehler des Mittelwertes).

Gewebe, andererseits durch das hieraus resultierende raschere Absterben der Tiere, daß zwischen Tumorgröße und Überlebenszeit eine enge Beziehung bestehen muß. Diese Beziehung konnten wir auch an anderer Stelle bestätigen, wo der gleiche Versuchstumor unter Ephynal-Behandlung mit Hyperthermie nicht beeinflußt werden konnte [12].

Die in den Voruntersuchungen gefundene vermehrte Wachstumstendenz des Sarkom S 180 unter Vitamin-E-Gaben fanden in der kombinierten Ephynal-Röntgen-Behandlung darin ihre Bestätigung, daß sich die Tumoren nicht zurückbildeten, sondern eine Resistenz gegenüber Röntgenstrahlen zeigten. Die starke Streuung der Tumortageswerte deutet eine völlig inhomogene Sarkombeeinflussung unter Vitamin E an.

Die von *Fischer* [3] beschriebene Hemmung der Lipoidperoxydbildung durch Vitamin E und die dadurch hervorgerufene verminderte Toxinwirkung hat sich hier bei Betrachtung der Überlebensraten nicht bestätigen lassen. Es ist daher sehr fraglich, ob dem Ephynal nur auf Grund des dort beschriebenen subjektiven Wohlbefindens strahlenbehandelter Patientinnen eine günstige therapeutische Einwirkung zugesprochen werden kann. Weiter ist aus den Ergebnissen übereinstimmend mit Untersuchungen von *Fritz-Niggli* [13] sowie *Halev* und Mitarb. [14] kein Strahlenschutz des Vitamin E anzunehmen, es hat sich an den dortigen Letalitätstesten vielmehr eine erhöhte Sterberate unter Vitamin-E-Gaben abgezeichnet.

Während sich bei der eigentlichen Vitamin-E-Behandlung gegenüber den Tumormittelwerten der Röntgenkontrollen keinerlei signifikante Differenzen im gesamten Versuchsverlauf zeigten, entwickelten sich die Tumoren unter der Behandlung mit dem Ephynal-Lösungsmittel zunächst in den ersten 4 Tagen gegenüber den Röntgenkontrollen signifikant schneller, begannen sich aber

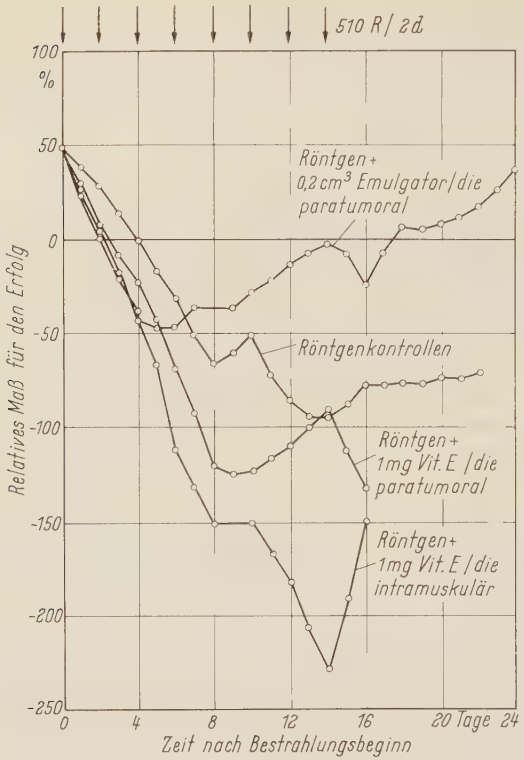


Abb. 12. Darstellung des Behandlungserfolges durch Superposition von Überlebensrate und Tumorvolumenänderung in Prozent. Weit im Negativen liegende Ergebnisse der mit Vitamin E kombinierten Röntgenbehandlung.

schon vom 5. Tag ab zurückzubilden und wiesen vom 11. Tag bis zum Ende der Beobachtungszeit signifikant kleinere Durchschnittswerte auf (Abb. 11).

Die geringe mittlere Streuung deutet auf eine homogenere Beeinflussung der Tumoren durch das Ephynal-Lösungsmittel hin. Bei dem von uns verwendeten Emulgator handelt es sich chemisch um ein polyoxyäthyliertes Triglyzerid der Rizinusölsäure. Ob seine Wirkung im gleichen Sinne zu deuten ist wie der hemmende Effekt bestimmter höherer Fettsäuren gegenüber der Entwicklung von Azofarbstofftumoren der Leber, wird weiterhin geprüft [15].

Aus der in Abbildung 12 dargestellten Methode, die nach einem System von *Barth, Graebner* und Mitarb. [1, 2, 7, 8, 9, 10] eine bessere Beurteilung von Tierversuchsreihen gewährleistet, ist ersichtlich, daß eine Vitamin-E-Behandlung die Tumorbestrahlung nicht im positiven Sinne unterstützt, sondern durch die weit im Negativen liegenden Ergebnisse eine Kombinationstherapie im Tierexperiment zumindest bei schnell wachsenden Tumoren in Frage stellt (Abb. 12).

Zusammenfassung

Tierexperimentelle Untersuchungen an 305 männlichen weißen Mäusen des Inzuchtstammes NMRI haben ergeben, daß eine Röntgenbehandlung, kombiniert mit Vitamin-E-Gaben, keine therapeutischen Konsequenzen nach sich zieht. Das hierbei für die Behandlung wirkungslos scheinende Lösungsmittel Ephynal führte dagegen zu signifikant besseren Tumorrückbildungen gegenüber alleiniger Röntgenbestrahlung.

Summary

Investigations using 305 male white mice of the inbreed strain NMRI show that there is no therapeutic effect with a combination of X-ray therapy and vitamin-E-administration. The solvent of the Ephynal which seems to be without effect for the treatment, causes, however, a much better tumor regression than X-ray irradiation alone.

Résumé

Des expériences faites sur 305 souris blanches mâles de la souche pure NMRI montrent qu'une radiothérapie combinée avec l'administration de vitamin E n'a pas d'effets thérapeutiques. Le moyen de la solution d'Ephynal, semblant sans effet pour le traitement, détermine par contre une amélioration significative de la regression tumorale comparativement à la radiothérapie seule.

Schrifttum

1. *Barth, G., E. Dister* u. *H. Graebner:* Strahlentherapie 121 (1963): 263. — 2. *Barth, G., H. Drechsel* u. *H. Graebner:* Strahlentherapie 121 (1963): 526. — 3. *Fischer, W.:* Münch. med. Wschr. 1959: 1487. — 4. *Lehnartz, E.:* Einführung in die chemische Physiologie, S. 221. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959. — 5. *Nitz-Litzow, D.,* u. *G. Bührer:* Strahlentherapie 113 (1960): 201. — 6. *Amse, St. R., J. G. Baxter* u. *J. G. Griffith:* Int. Z. Vitaminforsch. 22 (1955): 401. — 7. *Barth, G., H. Graebner* u. *H. Strössenreuther:* Strahlentherapie 113 (1960): 280. — 8. *Barth, G.,* u. *H. Graebner:* Strahlentherapie 115 (1961): 310. — 9. *Abramowski, P., G. Barth* u. *H. Graebner:* Strahlentherapie 118 (1962): 375. — 10. *Barth, G., H. Graebner* u. *F. Wachsmann:* Strahlentherapie 112 (1960): 280. — 11. *Frey, J.:* Arch. exp. Path. Pharmak. 221 (1953): 475. — 12. *Barth, G., H. Graebner, H. Gütt* u. *W. Kern:* Arch. phys. Ther. 1963 (im Druck). — 13. *Fritz-Niggli, H.:* Münch. med. Wschr. 1961: 45. — 14. *Halev, Th., J. McCullok* u. *W. G. McCormik:* Science 119 (1954): 3082. — 15. *Bär, F.:* Arzneimittel-Forsch. 1954: 359.

Lebenslauf

Am 14. September 1938 wurde ich, Claus Philipp Lehr, als Sohn des Oberstudienrat a. D. Konrad Lehr und seiner Ehefrau Ida, geb. Loos, in Erlangen geboren.

Nach vierklassigem Besuch der Volksschule in Erlangen trat ich am 1. 9. 1948 in das dortige humanistische Gymnasium Fridericianum ein. Im Juni 1957 bestand ich an dieser Schule die Reifeprüfung und begann im folgenden November das Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen.

Nach bestandener naturwissenschaftlicher Vorprüfung 1958 und ärztlicher Vorprüfung im Wintersemester 1959/60 verließ ich Erlangen und studierte in Wien und in Homburg/Saar. Im Sommersemester 1961 kehrte ich nach Erlangen zurück, wo ich nach dem Wintersemester 1963 die ärztliche Prüfung ablegte.